



ניטור חומרים גנוטוקסיים באמצעות חיישנים ביולוגיים:

שימוש בחיידק *E.coli* מהונדס לניטור מזהמים בדגימות מים.

במעבדה זו תקבלו 3 זנים של החיידק *E.coli* שהונדסו לשמש כביו-סנסורים לחומרים העלולים לגרום נזקים ל-DNA. לכל שלושת הזנים הוחדר פלסמיד ובו שני מרכיבים מרכזיים: **חייש וגן מדווח**. החייש הוא פרומוטור (אתר מקדם) המופעל רק כאשר יש הצטברות נזקים ב-DNA ומערכת ה-SOS של החיידק מופעלת; **הגן המדווח** מקודד לאנזים הנקרא: אלקלין פוספטאז, אנזים שאת פעילותו קל מאוד למדוד במעבדה. ארגון שני המרכיבים הללו בפלסמיד הוא כך שכאשר האתר המקדם מופעל (החייש מופעל), יש ביטוי לגן המדווח, ונוצר האנזים אלקלין פוספטאז.

אלפה: האם ניתן לאמר שכמות האלקלין פוספטאז הנוצרת תהיה ביחס ישיר לאיכות הנזק שנאכרה

DNA? בחיידק?

שניים מהזנים בהם נשתמש במעבדה הם בעלי מוטציות נוספות המגדילות את רגישות החיידקים למזהמים סביבתיים. המוטציות הן מוטציות המגדילות את תכונות החדירות של החיידק או מוטציות המשנות (מקטינות) את יכולת תיקון ה-DNA של החיידק.

הגנוטיפים של הזנים עימם נעבוד הינם:

- **W** - זן הבר. כל הגנים תקינים.
- **E** - מוטנט הפגוע בגן המקודד לאחד ממרכיבי הקרום החיצוני של החיידק (ליפופוליסכאריד). העדר הליפופוליסכאריד מגדיל מאוד את חדירות הקרום למולקולות גדולות יחסית.
- **A** - מוטנט הפגוע בגן הקשור לתיקון נזקים ב-DNA: גן זה מקודד לחלבון המזהה פגמים במבנה המרחבי של

ה-DNA. חוסר תפקוד של החלבון מעלה באופן משמעותי את הרגישות של חיידקים אלו לנזקים ב-DNA.

אלפה: מדוע חשוב להאזין את רגישות החיידקים המשנים כמיוסנסורים לחומרים מזהמים?

במהלך המעבדה נבדוק את השפעתם של ריכוזים שונים של שני סוגי מזהמים על ביטוי הגן המדווח שהוחדר למוטנטים השונים.

במהלך שעה של הדגרה של המוטנטים השונים בנוכחות ריכוזים שונים של מזהמים תמדדו את הצפיפות האופטית של התרביות השונות מידי 15 דקות. בתום שעה, תשטפו את החיידקים ותיקחו דוגמא מכל תרבית לבדיקת פעילות האנזים אלקלין-פוספטאז. פעילות האנזים תיבדק ע"י הוספה של סובסטרט מלאכותי, שקוף, בשם pNPP, שפירוקו נותן תוצר בצבע צהוב. תנאי הבדיקה הם בעודף גדול של pNPP כך שככל שכמות האנזים גדולה יותר, עוצמת הצבע הצהוב תהיה חזקה יותר.



שימו לב: תלמידים שעובדים עם הרעלן H_2O_2 ישתמשו בזנים W ו-A.

תלמידים שעובדים עם הרעלן NA ישתמשו בזנים W ו-E.

הכנת מיהולים כפולים של הרעלן (מי חמצן/נלדיקסיק אסיד):

לידיעתך: הריכוז ההתחלתי של הרעלנים הוא: מי חמצן (H_2O_2): 0.5 % ; נלדיקסיק אסיד (NA) 2000 ppm

1. סמן 5 מבחנות **אפנדורף רגילות** במספרים T0, T1, T2, T3, T4.
2. כוון פיפטור של 1000μ ל-500 והלבש טיפ חדש.
3. הכנס למבחנות T1, T2, T3 500μ מים מזוקקים (DDW)
4. כוון את הפיפטור של 1000μ ל-1000 והלבש טיפ חדש.
5. הכנס למבחנה המסומנת T0 1000μ מים מזוקקים (DDW). פקוק המבחנה.
6. זרוק הטיפ, והלבש טיפ חדש על הפיטור.
7. הכנס למבחנה T4 1000μ מהרעלן שעל המגש (H_2O_2 או NA)
8. כוון הפיפטור ל-500 והלבש טיפ חדש.
9. העבר 500μ מהרעלן במבחנה מספר T4 למבחנה מספר T3
10. פקוק את המבחנה וערבב היטב על ידי היפוך המבחנה+ ערבול על הוורטקס
11. **החלף טיפ!**
12. העבר 500μ מהרעלן במבחנה מספר T3 למבחנה מספר T2
13. פקוק את המבחנה וערבב היטב על ידי היפוך המבחנה+ ערבול על הוורטקס
14. **החלף טיפ!**
15. העבר 500μ מהרעלן במבחנה מספר T2 למבחנה מספר T1
16. פקוק את המבחנה וערבב היטב על ידי היפוך המבחנה+ ערבול על הוורטקס.



טבלה מסכמת לשלבים 1-16 להכנת מיהולים כפולים של הרעלן:

| T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | מספר מבחנה |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 1000 μ l | 500 μ l | 500 μ l | 500 μ l | - | מיים (DD) (W) |
| - | 500 μ l ממבחנה T2 | 500 μ l ממבחנה T3 | 500 μ l ממבחנה T4 | μ l 1000 | רעלן |
| | | | | | חישוב ריכוז סופי של הרעלן*: |

*יש להשתמש בערכים של הריכוז ההתחלתי ולכפול בפקטור המיהול.

הכנת החיידקים:

זני החיידקים השונים (מסומנים A, E, W) נמצאים בארלנמיירים באמבט המטלטל. תלמידים שעובדים עם הרעלן

H₂O₂ ישתמשו בזנים W ו-A. תלמידים שעובדים עם הרעלן NA ישתמשו בזנים W ו-E. לכל קבוצה מסומנות

המבחנות בפקקים בצבע שונה. זכור את צבע הפקקים של קבוצתך.

לפניך במעמד 10 מבחנות זכוכית.

שים לב: לכל חמש מבחנות עליך להעביר חיידקים מזן אחר.

1. סמן 5 מבחנות זכוכית באות W ובמספרים 0-4 (W0, W1, W2, W3, W4).

2. ערבב קלות את החיידקים בארלנמייר המסומן W

3. העבר לכל מבחנה 5 מ"ל חיידקים מהארלנמייר המסומן W. רשום גם את שמך על אחת המבחנות.

בדוק את הרישום על מגש העבודה, ובהתאם לזן החיידקים איתו אתה עובד: סמן 5 מבחנות זכוכית נוספות באות E

או A ובמספרים 0-4 (A0, A1, A2, A3, A4 או E0, E1, E2, E3, E4).

4. ערבב קלות את החיידקים בארלנמייר המסומן A או E.

5. העבר לכל מבחנה 5 מ"ל חיידקים מבקבוק המסומן E או A בהתאם לרעלן שבו תשתמש.



הקפד לסמן את המבחנות במספר הזן המתאים. המעמד עם המבחנות יראה כך :

| | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| W0 | W1 | W2 | W3 | W4 |
| E0 או A0 | E1 או A1 | E2 או A2 | E3 או A3 | E4 או A4 |

הוספת הרעלן לחיידקים:

6. כוון פיפטור של $100 \mu\text{l}$ ל- 50 והלבש טיפ חדש.
7. הוסף לכל אחת ממבחנות W0 ו A0 (או E0) $50 \mu\text{l}$ מהרעלן הנמצא במבחנה T0 וערבב בווקטרס
8. החלף טיפ!
9. הוסף לכל אחת ממבחנות W1 ו A1 (או E1) $50 \mu\text{l}$ מהרעלן במבחנה T1 וערבב בווקטרס
10. חזור על סעיפים 7-8 עם שאר מבחנות החיידקים והרעלן בריכוזים שונים, בהתאמה.

אתה, החיידקים יודעו 60 min דקות בטמפרטורה של 37°C בנוכחות הרעלן:

קריאת עכירות החיידקים:

11. כוון את מכשיר הספקטרופוטומטר לאורך גם 600 ננומטר.
12. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות
13. קרא את העכירות האופטית של החיידקים בכל 10 המבחנות, ורשום התוצאות בטבלאות רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7
14. הכנס את כל המבחנות להדגרה ב- 37°C בטילטול.
15. כוון סטופר ל 20 דקות.
16. זרוק את מבחנות האפנדורף עם הרעלן לכלי האשפה שעל שולחןך.
17. בזמן הנותר עד לקריאה הבאה הכן את המבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית ע"פ ההנחיות בעמוד 5.
18. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7.
19. כוון את הסטופר ל 20 דקות, והחזר את המבחנות לאמבט ב 37°C בטילטול.
20. בזמן הנותר עד לקריאה הבאה סמן את המבחנות לשיטפת החיידקים כמתואר בהמשך (סעיפים 1-2 בסעיף "שיטפת החיידקים")



21. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7
22. כוון את הסטופר ל 20 דקות, והחזר את המבחנות לאמבט ב 37°C בטילטול.
23. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7
24. העבר את החיידקים לסל הקרח.

שטיפת החיידקים:

1. העמד 10 מבחנות אפנדורף קטנות **רגילות** בתוך מעמד.
2. סמן 5 מבחנות בסימון: **W0** עד **W4** ו5 מבחנות בסימון: **A0** עד **A4** או **E0** עד **E4** בהתאם לזנים איתם אתה עובד). מבחנות אלה ישמשו לשטיפת החיידקים בהמשך.
3. כוון פיפטור של $1000\ \mu\text{l}$ ל- $900\ \mu\text{l}$
4. העבר $900\ \mu\text{l}$ מכל תרבית חיידקים למבחנת האפנדורף **הרגילות** המסומנת בהתאמה. לדוגמא: העבר ממבחנת הזכוכית המסומנת ב-**W0** למבחנת אפנדורף המסומנת ב-**W0**; ממבחנה **W1** למבחנת אפנדורף **W1**, וכך הלאה.
5. העבר את 10 מבחנות האפנדורף עם החיידקים לצנטריפוגה.
6. סרכז 5 דקות במהירות המקסימלית.
7. בתום הסירכוז, הוצא את מבחנות האפנדורף, בדוק שנראה בהן משקע, והכנס אותן למעמד המבחנות בעדינות.
8. שפוך את הנוזל העליון. **שימו לב לא לשפוך את המשקע!** במידת הצורך הוצא את הנוזל העליון עם פיפטור מכוון ל- 1000 מיקרוליטר, הישמר מלשאוב את משקע החיידקים.
9. הספג שאריות נוזל ע"י היפוך המבחנה על נייר סופג.
10. כוון פיפטור של $1000\ \mu\text{l}$ ל- $500\ \mu\text{l}$
11. העבר $500\ \mu\text{l}$ **מבופר מספר 1**, לכל אחת ממבחנות האפנדורף עם משקע החיידקים.
12. ערבב היטב בוורטקס את המשקע, עד להרחפת כל המשקע.
13. העבר את מבחנות האפנדורף עם החיידקים המרחפים לצנטריפוגה וסרכז 5 דקות במהירות מקסימלית.
14. בתום הסירכוז, הוצא את מבחנות האפנדורף, בדוק שנראה בהן משקע, והכנס אותן למעמד המבחנות בעדינות.
15. שפוך את הנוזל העליון. **שימו לב לא לשפוך את המשקע!** במידת הצורך הוצא את הנוזל העליון עם פיפטור מכוון ל- 1000 מיקרוליטר, הישמר מלשאוב את משקע החיידקים.
16. הספג שאריות נוזל ע"י היפוך המבחנה על נייר סופג.
17. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר ל- $300\ \mu\text{l}$



18. העבר $400 \mu\text{m}$ **מבפור מספר 2**, לכל אחת ממבחנות האפנדורף.
19. ערבב היטב בוורטקס עד להרפת כל המשקע.
20. הנח את המבחנות עם החיידקים המרחפים בסל הקרח.
21. התחל בביצוע התגובה האנזימטית (להלן)

הכנת מבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית:

25. העמד 10 מבחנות אפנדורף קטנות עם **נעילה** בתוך מעמד.
26. סמן 5 מבחנות בסימון: W0 עד W4 ו5 מבחנות בסימון: A0 עד A4 (או E0 עד E4 בהתאם לזנים איתם אתה עובד)
27. כוון פיפטור של $1000 \mu\text{L}$ ל- $900 \mu\text{L}$
28. העבר $900 \mu\text{m}$ ממבחנה המסומנת "**בופר ריאקציה**", לכל אחת מ- 10 מבחנות האפנדורף המסומנות עם הנעילה.
בופר הריאקציה מכיל את הסובסטר לאנזים אלקליין פוספאטז ואת הדטרגנט SDS
מחורר את קרואי החיידקים ומאפשר לאנזים לצאת מהתא.
29. נעל היטב את פקקי המבחנות, הכנס אותן לסל הקרח וכסה אותם בגיליון של נייר כסף עד לשלב בו תשתמש בהן.
(התצרוכת רגישה לאור וצף כן יש לצסותה).

ביצוע התגובה האנזימטית:

1. הסר את נייר הכסף ממבחנות הריאקציה, והעבר אותן מסל הקרח למעמד שעל שולחנך.
2. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של $100 \mu\text{L}$.
3. הרחף קלות את החיידקים השטופים שנמצאים בסל הקרח, במבחנה **W0** באמצעות הפיפטור.
4. העבר $100 \mu\text{L}$ מהחיידקים השטופים **W0** למבחנת הריאקציה המסומנת W0.
5. החזר את החיידקים השטופים לסל הקרח.
6. **החלף טיפ!**
7. הרחף קלות את החיידקים השטופים במבחנה **W1** באמצעות הפיפטור.
8. העבר $100 \mu\text{L}$ מהחיידקים השטופים **W1** למבחנת הריאקציה המסומנת W1.
9. החזר את החיידקים השטופים לסל הקרח. **החלף טיפ!**
10. העבר באותו אופן חיידקים מכל המבחנות לכל מבחנות הריאקציה. שים לב להחליף טיפ בכל פעם שתשתמש בחיידקים ממבחנה אחרת.



11. כוון פפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של 50μ .
12. הוסף לכל אחת מעשר מבחנות הריאקציה 50μ כלורופורם. (הכלורופורם מכיל את החוריס בקרום התא ומיצף את יציאת האנזים מהתא)
13. נעל במהירות היטב כל מבחנה לאחר הוספת הכלורופורם (הכלורופורם נדיף).
14. ערבב את תערובת הריאקציה היטב ע"י היפוך המבחנה ובעזרת הוורטקס.
15. כוון את הסטופר ל 30 דקות.
16. הכנס את מבחנות הריאקציה לאמבט של 37°C . למשך 30 דקות. בזמן זה עליך להתחיל להכין את פלטת הקריאה (להלן).

הכנת פלאטת קריאה

כאלי: יהיה עליך להעביר גם את רחיצ'י החיידקים השטופים וגם את צרובת הריאקציה לצלחות שבהן 96 באריות ממוספרות. הקפד להחזיק כל צלחת בשוליה ולא לאצת בתחתיתה. הקפד לקחת את הדואמאות מהפאנה הצליונה של המבחנה! הפאנה התחתונה צכורה והדבר מכריע לקריאת צוצמנת הצבצ.

אחרי העברת הדוגמאות, תוכל לקרוא את הבליעה בעזרת ספקטרופוטומטר מיוחד (**Microplate Reader**).

1. סמן את פלאטת 96 הבאריות כפי שמצוין ברישום להלן:

| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| OD600 | W | A | | | | | | | | | | | | |
| | W | B | | | | | | | | | | | | |
| | A | C | | | | | | | | | | | | |
| | A | D | | | | | | | | | | | | |
| OD405 | W | E | | | | | | | | | | | | |
| | W | F | | | | | | | | | | | | |
| | A | G | | | | | | | | | | | | |
| | A | H | | | | | | | | | | | | |



העברת החיידקים: שימו לב להכניס הנוזל למרכז הבארית, ללא בועות

2. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של $100 \mu\text{l}$
3. ערבב את החיידקים השטופים במבחנה **W0** בעדינות בוורטקס
4. העבר $100 \mu\text{l}$ מהחיידקים לבארית A1 ולבארית B1 לקבלת 2 חזרות.
5. החלף טיפ.
6. ערבב את החיידקים השטופים במבחנה **W1** בעדינות בוורטקס
7. העבר $100 \mu\text{l}$ מהחיידקים לבארית A2 ולבארית B2 לקבלת 2 חזרות; החלף טיפ.
8. העבר באותו אופן חיידקים מכל 10 המבחנות לבאריות המתאימות: ממבחנה W2 לבאריות A3 ו B3 לקבלת 2 חזרות; ממבחנה **W3** לבאריות A4 ו B4 וכו'. בתום ההעברה באריות A1 עד D5 אמורות להיות מלאות בחיידקים מהדגימות השונות.

העברת דגימות מהריאקציה האנזימטית:

9. בתום 30 דקות (עם השמע צלצול השעון) הוצא את מבחנות האפנדוף (עם הנעילה) של קבוצתך מהאמבט, נגב אותן היטב והבא אותן לשולחן העבודה.

שימו לב להכניס הנוזל למרכז הבארית, ללא כלורופורם וללא בועות!

10. העבר $100 \mu\text{l}$ מכל אחת ממבחנות הריאקציה המסומנת ב-A או W ומספר 0,1,2,3,4, לבאריות המתאימות בפלאטה, לאזור המסומן ב-OD405, בארבעת השורות הארוכות. (ממבחנה W0 לבאריות E1 ו F1; ממבחנה W1 לבאריות E2 ו F2 וכו'. בתום ההעברה באריות E1 עד H5 אמורות להיות מלאות בתוצרי הריאקציה האנזימטית מהדגימות השונות).
11. בעזרת המדריך, קרא במכשיר Eliza את הבליעה באורך גל של 405 ננומטר ואחר כך קרא באורך גל 600 ננומטר. לאחר הקריאה תקבל שני דפים: בדף האחד יהיו תוצאות הקריאה באורך גל 405 והשני הקריאה באורך גל 600.

העברת נתונים לקובץ אקסל

העתק את קריאת ה-OD באורך גל 600 ו 405 לקובץ האקסל, למיקום הרלוונטי (יש סימון לכל אחד מאורכי הגל).



טבלה למדידת עכירות החיידקים (O.D.) עם ריכוזים שונים של רעלן:

| W4 | W3 | W2 | W1 | W0 | זמן (דקות) |
|----|----|----|----|----|------------|
| | | | | | 0 |
| | | | | | 20 |
| | | | | | 40 |
| | | | | | 60 |

| A4/E4 | A3/E3 | A2/E2 | A1/E1 | A0/E0 | זמן (דקות) |
|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| | | | | | 0 |
| | | | | | 20 |
| | | | | | 40 |
| | | | | | 60 |